

TENT COOPERATION TRE.

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	
International application No. PCT/JP00/00778	Applicant's or agent's file reference P-416
International filing date (day/month/year) 14 February 2000 (14.02.00)	Priority date (day/month/year) 15 February 1999 (15.02.99)
Applicant MATSUYAMA, Shinji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

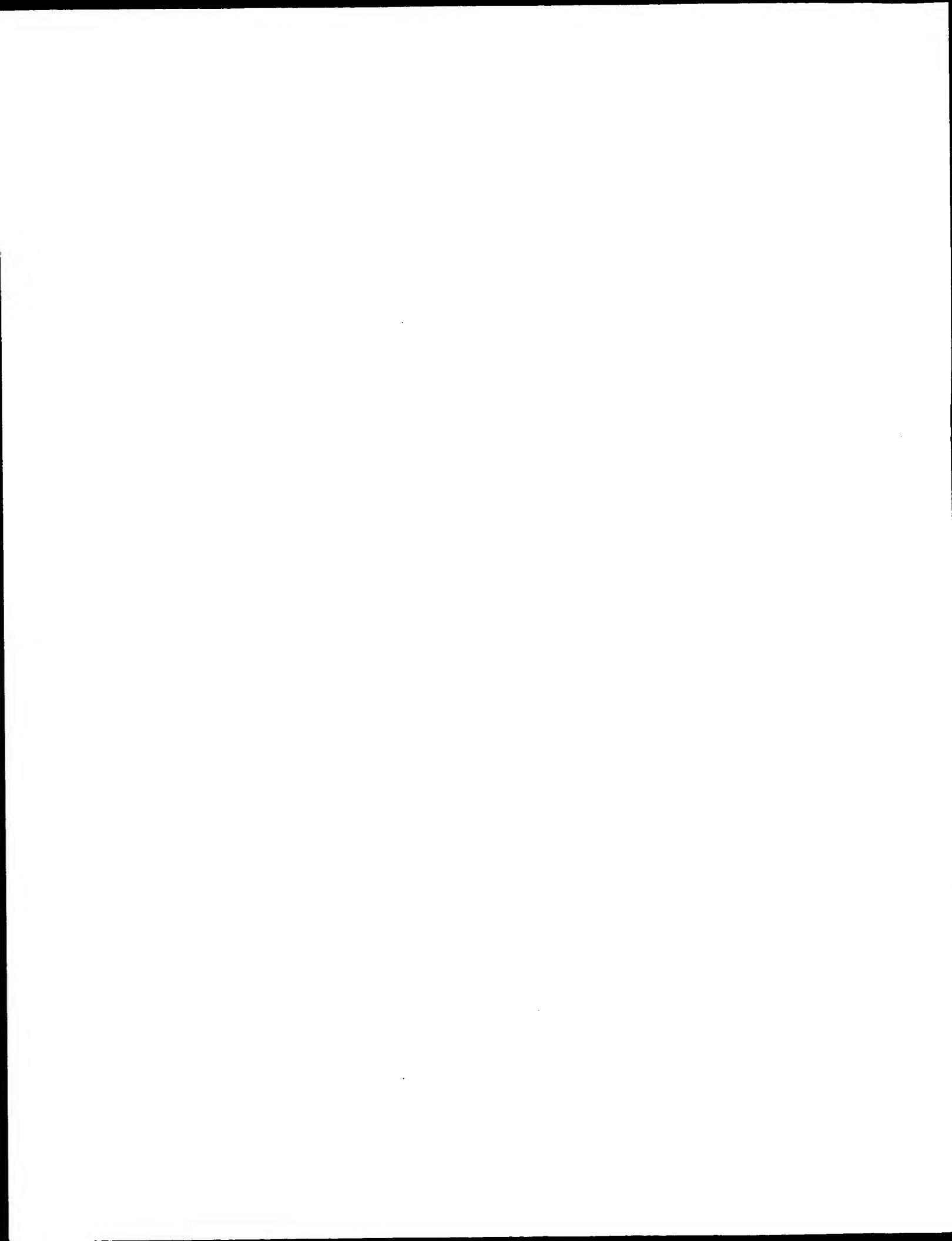
☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
04 August 2000 (04.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Henrik Nyberg
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.), 30 May, 1972 (30.05.72) & JP, 46-6747, A & GB, 1355516, A	1-5, 7 6, 8-13
X Y	US, 5298614, A (Nippon Shinyaku Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29.03.94) & JP, 1-238597, A2 & GB, 2207138, A	1-8 7, 9-13
Y	WO, 94/19314, A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd.), 01 September, 1994 (01.09.94) & EP, 685457, A1 & US, 6020317, A	8-13
Y	K. Tahira, "Phosphorus no kagaku-shudo rotation wo chushin ni-", "Tanpakushitsu Kakusan Koso", 1995, Vol. 40, No. 10, pp. 141-150	6
Y	K. Imahori, et al., "Seikagaku jiten, 3 rd printing", 1998, pp. 1308-1309 "Phosphodiesterase"	7
X Y	HIROSHI YAMAUCHI, HARUHIKO MACHIDA, "Continuous Production of Homopolynucleotides by Immobilized Polynucleotide phosphorylase", Journal of Fermentation	1-5 6-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
24 April, 2000 (24.04.00)Date of mailing of the international search report
16 May, 2000 (16.05.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Technology, 1986, Vol. 64, No. 6, p. 517-522	
X Y	N.S.SIDOROVA, E.M.KOGAN, N.G.NAUMOVICH, "complexes of polyriboguanilate with modified polyribocytidylate", Nucleic Acids Research Symposium series, 1987, No.18, p.113-116	1-5 6-13
X Y	HARUHIKO MACHIDA, AKIRA KUNINAKA, HIROSHI YOSHINO, "Relationship between the Molecular Size of Poly I · Poly C and Its Biological Activity", Japanese Journal of Microbiology, 1976, Vol.20, No.2, p.71-76	1-5 6-13
X Y	GEORGE P.LAMPSON, A.KIRK FIELD, ALFRED A.TYTELL, MARJORIE M.NEMES, MAURICE R. HILLEMANN, "Relationship of molecular Size of rIn:rCn (Poly I:C) to Induction of Interferon and Host Resistance", Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol.135, No.3, p.911-916	1-5 6-13
X Y	ALFRED A.TYTELL, GEORGE P.LAMPSON, A.KIRK FIELD, MARJORIE M.NEMES, MAURICE R. HILLEMANN, "Influence of Size of Individual Homopolynucleotides on the Physical and Biological Properties of Complexed rIn:rCn (Poly I:C)", Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol.135, No.3, p.917-921	1-5 6-13
X Y	GEORGE P.LAMPSON, MARJORIE M.NEMES, A.KIRK FIELD, ALFRED A.TYTELL, MAURICE R. HILLEMANN, "The Effect of Altering the Size of Poly C on the Toxicity and Antigenicity of Poly I:C", Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1972, Vol.141, No.3, p.1068-1072	1-6 7-13
X Y	S.J.MOHR, D.G.BROWN, D.S.COFFEY, "Size Requirement of Polyinosinic Acid for DNA Synthesis, Viral Resistance, and Increased Survival of Leukaemic Mice", Nature New Biology, 1972, Vol.240, No.103, p.250-252	1-5 6-13
X Y	W.E.STEWART II, E.DE CLERCQ, "Relationship of Cytotoxicity and Interferon-inducing Activity of Polyribonucleosinic Acid. Polyribocytidylic Acid to the Molecular Weights of the Homopolymers", Journal of General Virology, 1974, Vol.23, No.1, p.83-89	1-5 6-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/00778

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30. 5月. 1972 (30. 05. 72) & JP, 46-6747, A & GB, 1355516, A	1-5, 7 6, 8-13
X Y	US, 5298614, A (日本新薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94) & JP, 1-238597, A2 & GB, 2207138, A	1-8 7, 9-13
Y	WO, 94/19314, A1 (日本新薬株式会社) 1. 9月. 1994 (01. 09. 94) & EP, 685457, A1 & US, 6020317, A	8-13

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 04. 00

国際調査報告の発送日

16.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之 印

4P

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	多比良和誠、"リンの化学—シュードローテーションを中心に—" 、「蛋白質 核酸 酵素」、1995年、第40巻、第10号、 第141-150頁	6
Y	今堀和友、山川民夫監修「生化学辞典(第3版)」、1998 年」、第1308-1309頁「ホスホジエステラーゼ」	7
X Y	HIROSHI YAMAUCHI, HARUHIKO MACHIDA, "Continuous Production of Homopolynucleotides by Immobilized Polynucleotide phosphoryl ase", Journal of Fermentation Technology, 1986, Vol. 64, No. 6, p. 5 17-522	1-5 6-13
X Y	N. S. SIDOROVA, E. M. KOGAN, N. G. NAUMOVICH, "Complexes of polyribog uanilate with modified polyribocytidylate", Nucleic Acids Res earch Symposium Series, 1987, No. 18, p. 113-116	1-5 6-13
X Y	HARUHIKO MACHIDA, AKIRA KUNINAKA, HIROSHI YOSHINO, "Relationshi p between the Molecular Size of Poly I·Poly C and Its Biolo gical Activity", Japanese Journal of Microbiology, 1976, Vol. 2 0, No. 2, p. 71-76	1-5 6-13
X Y	GEORGE P. LAMPSON, A. KIRK FIELD, ALFRED A. TYTELL, MARJORIE M. NEM ES, MAURICE R. HILLEMANN, "Relationship of molecular Size of rIn :rCn(Poly I:C) to Induction of Interferon and Host Resistanc e", Proceedings of the Society for Experimental Biology and M edicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 911-916	1-5 6-13
X Y	ALFRED A. TYTELL, GEORGE P. LAMPSON, A. KIRK FIELD, MARJORIE M. NEM ES, MAURICE R. HILLEMANN, "Influence of Size of Individual Homopol ynucleotides on the Physical and Biological Properties of Co mplexed rIn:rCn(Poly I:C)", Proceedings of the Society, for Ex perimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 917-921	1-5 6-13
X Y	GEORGE P. LAMPSON, MARJORIE M. NEMES, A. KIRK FIELD, ALFRED A. TYTE LL, MAURICE R. HILLEMANN, "The Effect of Altering the Size of Po ly C on the Toxicity and Antigenicity of Poly I:C", Proceedin g of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1972, Vol. 141, No. 3, p. 1068-1072	1-6 7-13
X Y	S. J. MOHR, D. G. BROWN, D. S. COFFEY, "Size Requirement of Polyinosi nic Acid for DNA Synthesis, Viral Resistance, and Increased Su rvival of Leukaemic Mice", Nature New Biology, 1972, Vol. 240, N o. 103, p. 250-252	1-5 6-13
X Y	W. E. STEWART II, E. DE CLERCQ, "Relationship of Cytotoxicity and Interferon-inducing Activity of Polyribonucleosinic Acid. Polyr ibocytidylic Acid to the Molecular Weights of the Homopolyme rs", Journal of General Virology, 1974, Vol. 23, No. 1, p. 83-89	1-5 6-13

E P

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則 43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 P-416	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 0 7 7 8	国際出願日 (日.月.年) 1 4 . 0 2 . 0 0	優先日 (日.月.年) 1 5 . 0 2 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 日本新薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (P C T 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30. 5月. 1972 (30. 05. 72) & JP, 46-6747, A & GB, 1355516, A	1-5, 7 6, 8-13
X Y	US, 5298614, A (日本新薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94) & JP, 1-238597, A2 & GB, 2207138, A	1-8 7, 9-13
Y	WO, 94/19314, A1 (日本新薬株式会社) 1. 9月. 1994 (01. 09. 94) & EP, 685457, A1 & US, 6020317, A	8-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 04. 00

国際調査報告の発送日

1 6.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 P

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	多比良和誠、"リンの化学—シュードローテーションを中心に— 、「蛋白質 核酸 酵素」、1995年、第40巻、第10号、 第141—150頁	6
Y	今堀和友、山川民夫監修「生化学辞典(第3版)」、1998 年」、第1308—1309頁「ホスホジエステラーゼ」	7
X Y	HIROSHI YAMAUCHI, HARUHIKO MACHIDA, "Continuous Production of Homopolynucleotides by Immobilized Polynucleotide phosphoryl ase", Journal of Fermentation Technology, 1986, Vol. 64, No. 6, p. 5 17-522	1-5 6-13
X Y	N. S. SIDOROVA, E. M. KOGAN, N. G. NAUMOVICH, "Complexes of polyribog uanilate with modified polyribocytidylate", Nucleic Acids Res earch Symposium Series, 1987, No. 18, p. 113-116	1-5 6-13
X Y	HARUHIKO MACHIDA, AKIRA KUNINAKA, HIROSHI YOSHINO, "Relationshi p between the Molecular Size of Poly I · Poly C and Its Biolo gical Activity", Japanese Journal of Microbiology, 1976, Vol. 2 0, No. 2, p. 71-76	1-5 6-13
X Y	GEORGE P. LAMPSON, A. KIRK FIELD, ALFRED A. TYTELL, MARJORIE M. NEM ES, MAURICE R. HILLEMANN, "Relationship of molecular Size of rIn :rCn(Poly I:C) to Induction of Interferon and Host Resistanc e", Proceedings of the Society for Experimental Biology and M edicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 911-916	1-5 6-13
X Y	ALFRED A. TYTELL, GEORGE P. LAMPSON, A. KIRK FIELD, MARJORIE M. NEM ES, MAURICE R. HILLEMANN, "Influence of Size of Individual Homopol ynucleotides on the Physical and Biological Properties of Co mplexed rIn:rCn(Poly I:C)", Proceedings of the Society, for Ex perimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 917-921	1-5 6-13
X Y	GEORGE P. LAMPSON, MARJORIE M. NEMES, A. KIRK FIELD, ALFRED A. TYTE LL, MAURICE R. HILLEMANN, "The Effect of Altering the Size of Po ly C on the Toxicity and Antigenicity of Poly I:C", Proceedin g of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1972, Vol. 141, No. 3, p. 1068-1072	1-6 7-13
X Y	S. J. MOHR, D. G. BROWN, D. S. COFFEY, "Size Requirement of Polyinosi nic Acid for DNA Synthesis, Viral Resistance, and Increased Su rvival of Leukaemic Mice", Nature New Biology, 1972, Vol. 240, N o. 103, p. 250-252	1-5 6-13
X Y	W. E. STEWART II, E. DE CLERCQ, "Relationship of Cytotoxicity and Interferon-inducing Activity of Polyribonucleosinic Acid. Polyr ibocytidylic Acid to the Molecular Weights of the Homopolymer s", Journal of General Virology, 1974, Vol. 23, No. 1, p. 83-89	1-5 6-13

PATENT COÖPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

NIPPON SHINYAKU CO. LTD.
 14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho
 Minami-ku, Kyoto-shi
 Kyoto 601-8550
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 28 May 2001 (28.05.01)	
Applicant's or agent's file reference P-416	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/00778	International filing date (day/month/year) 14 February 2000 (14.02.00)
Applicant NIPPON SHINYAKU CO. LTD. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,KP,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Elliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C07H 21/02, A61K 31/7088, A61P 37/04, 43/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/47601 (43) 国際公開日 2000年8月17日(17.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00778 (22) 国際出願日 2000年2月14日(14.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/35963 1999年7月15日(15.07.99) JP <i>15 Aug 01/30 mor</i> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本新薬株式会社(NIPPON SHINYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒601-8550 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松山伸二(MATSUYAMA, Shinji)(JP/JP) 〒607-8186 京都府京都市山科区大宅早稲ノ内町7 Kyoto, (JP) 石山幸一(ISHIYAMA, Kouichi)(JP/JP) 〒305-0035 茨城県つくば市松代三丁目25 2号棟305号 Ibaraki, (JP) 関 純造(SEKI, Junzo)(JP/JP) 〒567-0032 大阪府茨木市西駅前町13-11 Osaka, (JP) 大木忠明(OHGI, Tadaaki)(JP/JP) 〒300-0013 茨城県土浦市神立町3628-80 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: SHORTENED-CHAIN POLYNUCLEOTIDES AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF (54) 発明の名称 短鎖化ポリヌクレオチド及びその製法 (57) Abstract Shortened-chain polynucleotides useful as drugs and medicinal compositions containing the same. Specifically, shortened-chain polynucleotides or salts thereof, characterized by the content of 2'-5' phosphoric diester linkage of 3 % or below based on all the phosphoric diester linkages; and medicinal compositions containing both.		

本発明の目的は、医薬として特に有用な短鎖化ポリヌクレオチドやそれを含有する医薬組成物を提供することにある。

本発明は、短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩、及びそれらいずれかを含有する医薬組成物である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ・ピサオ	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	US	米国
CI	コートジボアール	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国				
DK	デンマーク						

明 細 書

短鎖化ポリヌクレオチド及びその製法

技 術 分 野

本発明は、特に医薬として有用な短鎖化ポリヌクレオチド、及びその製法に関するものである。詳細には、本発明は、短鎖化された合成ポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下、即ち、全リン酸ジエステル結合のリン酸基に対して、3'位から2'位に転位したリン酸基の割合（リン酸転位率）が3%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩、及びそれらの製法に関するものである。

背 景 技 術

ポリイノシン酸・ポリシチジル酸、即ち、poly(I)・poly(C) に代表されるポリヌクレオチドは、当業者において周知の化合物であり、インターフェロン誘導作用、免疫賦活作用等を有することから、肝炎治療剤や癌治療剤としての可能性が検討されてきた。

かかるポリヌクレオチドの薬理作用は、その鎖長と高い相関があり、鎖長が長くなればなるほどインターフェロン誘導作用等が強くなる。しかし、その反面、鎖長が長くなればなるほど毒性が強く現れる。

最近、ポリヌクレオチドを加水分解によって短鎖化した比較的短い合成ポリヌクレオチドをカチオニック・リポソームのような、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体に封入するといった手法によ

り、ポリヌクレオチドの有用な薬理作用を保持しつつ、毒性を軽減する試みがなされている（例えば、PCT W099/20283号、PCT W099/48531 号）。

ところで、上記のようにポリヌクレオチドを加水分解によって短鎖化すると、短鎖化と同時にシュードローテーションという機構を介して、一部のリン酸基が3'位から2'位へ分子内転位することが知られている（例えば、「蛋白質 核酸 酵素」Vol.40, No.10, pp. 1323-1332 (1995)参照）。その結果、短鎖化ポリヌクレオチド分子内の3'-5'リン酸ジエステル結合の一部が、2'-5'リン酸ジエステル結合に置き換わることになる。このようなリン酸基の転位現象が薬理作用にどのような影響を及ぼすのかは知られていない。

発 明 の 開 示

本発明の目的は、第一に、医薬としてより有効でより安全な短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩、並びにその二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩を提供することにある。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、主に短鎖化反応の際に生ずる2'-5'リン酸ジエステル結合を一定割合以下しか有しない短鎖化ポリヌクレオチド及びその塩が上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

本発明の一つは、従って、短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下、好ましくは2%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩である。

また、上記2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結

合の 3 % 以下、好ましくは 2 % 以下の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩において、二本鎖を形成しうる 2 つの短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩も本発明として挙げるることができる。さらには、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、上記 2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3 % 以下の短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩、又はその二本鎖を形成しうる 2 つの短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩とを必須構成成分として形成される複合体を含有する組成物も本発明として挙げるることができる。

本発明に係るポリヌクレオチドは、各々のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を介して直鎖状に重合した化合物で、重合するヌクレオチドの数がおよそ 20 個以上のものをいい、合成又は天然のものを挙げるることができる。具体例としては、ポリイノシン酸（即ち、poly(I)）若しくはそのアナログ、ポリシチジル酸（即ち、poly(C)）若しくはそのアナログ、ポリアデニル酸（即ち、poly(A)）若しくはそのアナログ、又はポリウリジル酸（即ち、poly(U)）若しくはそのアナログを挙げるることができる。

ポリイノシン酸アナログは、イノシン酸の全部又は一部が化学修飾されたホモポリマーか、イノシン酸と他のヌクレオチドとのコポリマーであり、例えば、ポリ（7-デアザイノシン酸）、ポリ（2'-アジドイノシン酸）を挙げるることができる。ポリシチジル酸アナログは、シチジル酸の全部又は一部が化学修飾されたホモポリマーか、シチジル酸と他のヌクレオチドとのコポリマーであり、例えば、ポ

り（5-ブロモシチジル酸）、ポリ（2-チオシチジル酸）、ポリ（シチジン-5'-チオリン酸）、ポリ（シチジル酸、ウリジン酸）、ポリ（シチジル酸、4-チオウリジン酸）、ポリ（1-ビニルシチジル酸）を挙げることができる。ポリアデニル酸アナログ、ポリウリジル酸アナログも同様である。これらの中、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸が本発明において適当である。

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長としては、0.1k bases～1k bases（base: 塩基数、1k basesは1000塩基数、以下「base(s)」を単に「b」という）が適当であり、好ましくは200 b～800 bであり、更に好ましくは300 b～600 bである。当該平均鎖長は、例えば、後述する試験例5のような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー法（gel permeation chromatography、以下「GPC法」という）により容易に決定することができる。

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドは、リン酸転位率が3%以下であるが、好ましくは2%以下又は0.1%～2%、さらに好ましくは1%以下又は0.1%～1%である。

ポリヌクレオチドのリン酸基の3'位から2'位への転位は、例えば後述する試験例6のような方法により、容易に確認することができる。即ち、3'-5'リン酸ジエステル結合を特異的に加水分解するヌクレアーゼP₁酵素によりポリヌクレオチドをヌクレオシド、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドレベルまで分解した後、末端のリン酸基を特異的に加水分解するアルカリホスファターゼ酵素で処理することにより全ヌクレオチドをヌクレオシドに変換する。一方、ヌクレアーゼP₁酵素により分解されない2'-5'リン酸ジエステル結合

を有するオリゴヌクレオチドは、アルカリホスファターゼ酵素で処理しても、分子内の2'-5' リン酸ジエステル結合が加水分解されないでヌクレオシドにまで分解されない。液体クロマトグラフィー等を用いて、ヌクレオシドとオリゴヌクレオチド（大部分は二量体）を定量することにより、リン酸転位率を求めることができる。

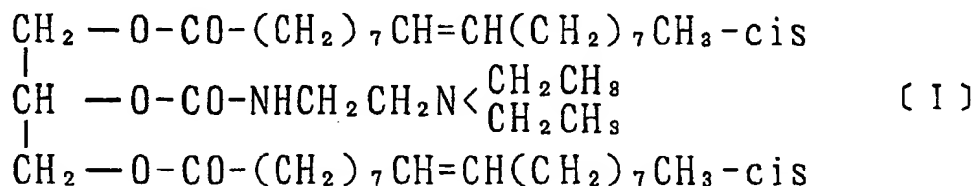
本発明における二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドとしては、例えば、ポリイノシン酸とポリシチジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸、ポリイノシン酸とポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸アナログを挙げることができる。従って、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドから形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとしては、例えば、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸、ポリアデニル酸・ポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログ・ポリシチジル酸、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログ・ポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログ・ポリウリジル酸、ポリアデニル酸・ポリウリジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログ・ポリウリジル酸アナログを挙げることができる。これらの中、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸が本発明において適当な二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとして挙げることができる。

上記二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長は、全短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長と考えるのが適当であり、この平均鎖長を

二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの見掛け上の平均鎖長として塩基対数で表現することができる。従って、上記二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長として、0.1k bp ～ 1k bp (bp: 塩基対数、1k bp は1000塩基対数) を挙げることができ、200 bp～800 bpが好ましく、300 bp～600 bpがより好ましい。

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの塩、及び二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドの塩としては、医薬上許容される塩なら特に制限はなく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩を挙げることができる。

薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体としては、例えば、正電荷を有する担体を挙げることができ、その具体例としては、ポリ-L-リジンのようなカチオン性ポリマーやリポフェクチン（登録商標）、リポフェクトアミン（登録商標）、リポフェクトエース（登録商標）、DMRIE-C（登録商標）等のカチオニック・リポソーム、またその一種と考えられ、PCT W094/19314号公報に開示されている、例えば、下記構造式〔I〕を有する2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロールとリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノールアミン、卵黄レシチン、大豆レシチン、これらの水素添加リン脂質）とを必須構成成分として形成される薬物担体を挙げることができる。



上記カチオニック・リポソームは、正電荷を有し、負電荷を有するポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドと静電的な複合体を形成し、それが細胞膜と融合するとともに、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが細胞内に移入されると考えられている。このような複合体は、リポプレックスと呼ばれることがある。

本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドの製造方法について詳述する。本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドは、例えば、出発物質であるポリヌクレオチド溶液を、適当なpH範囲、適当な温度範囲で加熱加水分解することにより製造することができる。その際の水溶液のpHは、pH 7以上の塩基性が適当であり、pH 7～10が好ましい。また、短鎖化反応の速度及び塩基部分の安定性を考慮すれば、pH 8～9がより好ましい。一方、反応温度は、塩基の安定性から20～110℃の範囲内が適当であり、40～100℃の範囲内が好ましい。しかし、十分な加水分解速度と塩基部分の安定性を考慮すれば、50～90℃の範囲内がより好ましい。

より具体的には、例えば、ポリヌクレオチドに水（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水など）を加え攪拌溶解し、緩衝剤やpH調節剤を用いてpH 8～9に調整する。そして反応温度50～90℃の範囲内において、平均鎖長とリン酸転位率をモニタリングしながら、0.5～60時間、加熱加水分解することにより、リン酸転位の少ない0.1 kb～1 kbの平均鎖長を有する短鎖化ポリヌクレオチドを製造することができる。

pHの調整には、医薬上許容される添加剤、例えば緩衝剤やpH調節剤を使用しても良い。具体的にはアミノ酢酸（別名、グリシン）、

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（別名、トリス）、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム（別名、重曹）、水酸化ナトリウム、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の緩衝剤やpH調節剤を挙げることができる。これらの種類、組み合わせ及び濃度等は何ら限定されない。

反応液を透析処理や活性炭処理等すれば、モノマーや不要な塩、不純物、短鎖化により生成した反応副生成物などを系外に除去することができる。

また、本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドは、例えば、出発物質であるポリヌクレオチド溶液を、適当なpH範囲、適当な温度範囲で、ホスホジエステラーゼを用いて製造することもできる。その際の反応液のpHは、pH 4～9が適当であり、pH 5～8が好ましい。また、反応時のリン酸転位を考慮すれば、pH 6～7がより好ましい。一方、反応温度は、酵素の性質を考慮すれば20～60℃の範囲内が適当であり、25～50℃の範囲が好ましい。しかし、十分な加水分解速度が得られること、酵素反応以外の熱による加水分解の影響が少ないこと、かつリン酸基の転位が起こらないことなどを考慮すれば、30～40℃の範囲内がより好ましい。

より具体的には、例えば、ポリヌクレオチドに水（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水など）を加え攪拌溶解する。必要ならば緩衝剤やpH調整剤を加えてpHを調整する。この液を例えばヌクレアーゼP₁のようなホスホジエステラーゼを加え、反応温度30～40℃の範囲内において、平均鎖長とリン酸転位率をモニタリングしながら短鎖化することによりリン酸転位の少ない0.1 kb～1 kbの平均

鎖長を有する短鎖化ポリヌクレオチドを製造することができる。酵素の濃度や反応条件等は何ら限定されない。

反応液をエタノール沈殿、透析処理、活性炭処理などすれば、酵素やモノマー、不要な塩、不純物、短鎖化により生成した反応副生成物などを系外に除去することができる。

短鎖化したポリヌクレオチドは、適当な膜分離により精製することができる。本発明に係る0.1 kb～1 kbの平均鎖長の範囲を分画する目的としては、例えば、限外ろ過メンブラン等が適当である。当該メンブランの材質や孔径等は何ら限定されない。

出発原料であるポリヌクレオチドは、天然、合成の起源、塩の種類、鎖長を問わない。天然のポリヌクレオチドとしては、例えば、tRNAやポリアデニル酸を挙げることができる。一方、合成ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドホスホリラーゼに代表されるRNA合成酵素やその固定化酵素から製造することができる。また、インターフェロン誘導試薬として市販されているポリイノシン酸ナトリウム塩やポリシチジル酸ナトリウム塩等を出発原料とすることもできる。

本発明に係る二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、上記のようにして得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリヌクレオチドの中、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドを、適当な溶液（例、0.15M NaCl含有10mMトリスー塩酸緩衝液（pH7））中で混合することにより得ることができ、また常法に従ってアニーリングすることにより得ることができる。アニーリングの方法としては、例えば、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドを含む溶液を70～

80℃まで昇温し、徐冷する方法を挙げることができる。

上記のようにして得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、凍結乾燥処理することができ、そうすることにより長期保存可能な凍結乾燥品を調製することができる。凍結乾燥処理は常法により行うことができる。例えば、上記条件にて得られた短鎖化ポリヌクレオチド溶液をろ過滅菌後、ろ液を乾熱滅菌処理した金属バットに注ぎ、-40 ~ -20 °Cの棚温度で予備凍結を1 ~ 4時間程度行い、一次乾燥後、棚温度15 ~ 30℃減圧下で二次乾燥（10 ~ 50時間程度）して凍結乾燥品を得ることができる。かかる凍結乾燥品は、一般には任意の適当な溶液（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水、マルトース溶液、グルコース溶液等）の添加により再溶解し使用することができる。

本発明に係る組成物、即ち、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下の短鎖化ポリヌクレオチドであって、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチド、又はその二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドから形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドとを必須構成成分として形成される複合体（以下「本複合体」という）を含有する組成物は、リポソームの一般的な製造方法と同様にして製造することができる。具体的には、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体、例えば、カチオニック・リポソーム又はその原料（例、2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0-ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体及びリン脂質）に、水（注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水等）を加えこれらを

攪拌混合し、この混合物を適当な分散機、例えば、ホモミキサー、ホモジナイザー、超音波分散機、超音波ホモジナイザー、高圧乳化分散機、マイクロフルイタイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、De Bee 2000（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントン-ガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて分散処理し、この脂質分散液に本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドを加え、再度適当な分散機で分散処理して本複合体を得た後、ろ過滅菌等の滅菌処理を行うことにより注射剤としての本発明組成物を製造することができる。その他の任意の添加剤は、製造時の適当な工程において添加することができ特に制限はない。また、薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体、例えば、カチオン性・リポソーム又はその原料（例、2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体及びリン脂質）、及び本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド又は二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドを予め混合し、この混合物に水を加えて、同時に分散処理して本複合体を含有する本発明組成物を製造することもできる。また、上記各製法において、適当な粗分散工程を経て製造することもできる。

得られた本発明組成物は、凍結乾燥処理することができる。凍結乾燥処理することにより長期保存可能な本発明組成物の凍結乾燥製剤を調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行うことができる。例えば、上記分散処理後、ろ過滅菌処理して得られた本発明組成物を、所定量をバイアル瓶に分注する。約-40 ～-20 ℃の条件で予備凍結を約2 ～3時間程度行い、約0 ～10℃で減圧下に一

次乾燥を行い、次いで、約15～25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥する。そして、一般的にはバイアル瓶内部を窒素ガス等の不活性ガスで置換し、打栓して本発明組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

本発明組成物の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水、マルトース溶液、グルコース溶液、その他一般的な輸液等をあげることができる。

本発明組成物、及びその凍結乾燥製剤は、薬剤として用いることができる。薬剤としての本発明組成物、及びその凍結乾燥製剤は、ポリヌクレオチドが有する薬理作用を発揮することができる。従って、当該薬剤の具体例としては、例えば、インターフェロン誘導化剤、免疫賦活剤、細胞内ヌクレアーゼ活性化剤、癌治療剤もしくは予防剤、又は肝炎治療剤もしくは予防剤を挙げることができる。

発明を実施するための最良の形態

本発明を実施例及び試験例を挙げて更に詳しく説明する。本発明はこれらの実施例及び試験例によって何ら限定されるものではない。

参考例 1

イノシン-5'-二リン酸三ナトリウム塩 8 g 及び塩化マグネシウム 1 g に、0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 500 mL を加え、攪拌溶解した。6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.3 に調整した後、38℃ で 1 時間静置した。更にポリヌクレオチドホスホリラーゼ溶液 1 mL を添加し、38℃ で 18 時間反応した。かかる反応液に 0.2 M エチレンジアミン四酢酸 25 mL を加えて反応を停止し、飽和食塩水 10 mL

及び無水エタノール500mLを加えてポリイノシン酸(1973 b)を沈殿させた。

参考例 2

シチジン-5'-二リン酸三ナトリウム塩10g及び塩化マンガン3gに、0.2 M炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液約1Lを加え、攪拌溶解した。6 N水酸化ナトリウムを加えpH 9.8に調整した後、36°Cで約1時間静置した。更に精製したポリヌクレオチドホスホリラーゼ溶液2mLを添加し、36°Cで24時間反応した。0.2 Mエチレンジアミン四酢酸50mLを加えて反応を停止した。かかる反応液に飽和食塩水20mL及び無水エタノール1Lを加えポリシチジル酸(3300 b)を沈殿させた。

実施例 1

参考例1で得たポリイノシン酸を遠心分離し、その沈殿物を注射用水500 mLに再溶解して透析処理した。透析内液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、ろ液に6 N水酸化ナトリウムを加えpH 8.5に調整し、70°Cで8時間、加熱加水分解し当該ポリイノシン酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、透析処理を行った。透析内液をろ過滅菌後、ろ液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド(ポリイノシン酸のナトリウム塩)の凍結乾燥品1.9 gを得た(リン酸転位率0.2%、平均鎖長360 b)。

実施例 2

参考例2で得たポリシチジル酸を遠心分離し、その沈殿物を注射

用水500mL に再溶解して透析処理した。透析内液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、ろ液に 6 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.0 に調整し、80°C で 4 時間、加熱加水分解し当該ポリシチジル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を活性炭処理し、ろ過操作により活性炭を除去した後、透析処理を行った。透析内液をろ過滅菌後、ろ液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリシチジル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 2.7 g を得た（リン酸転位率 0.1%、平均鎖長 318 b）。

実施例 3

ポリアデニル酸ナトリウム塩（ $S^{0.20.0}_{20.0}$ （沈降定数）：7.2、生化学工業（株）製）1 g に、0.1 M トリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）200 mL を加えて攪拌溶解した。試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、60°C で 48 時間、加熱加水分解することにより当該ポリアデニル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を透析処理した後、透析内液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリアデニル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 0.3 g を得た（リン酸転位率 1.9%、平均鎖長 154 b）。

実施例 4

ポリウリジル酸ナトリウム塩（ $S^{0.20.0}_{20.0}$ （沈降定数）：6.5、生化学工業（株）製）1 g に、0.2 M グリシンー水酸化ナトリウム緩衝液（pH 9.0）200 mL を加えて攪拌溶解した。試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、60°C で 25 時間、加熱加水分解す

ることにより当該ポリウリシル酸を短鎖化した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を透析処理した後、透析内液を常法により凍結乾燥処理し、リン酸転位の少ない本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチド（ポリウリシル酸のナトリウム塩）の凍結乾燥品 0.2 g を得た（リン酸転位率 1.2%、平均鎖長 108 b）。

実施例 5

ポリイノシン酸ナトリウム塩（ $S^0_{20,w}$ （沈降定数）：8.8、ヤマサ醤油（株）製）250 mgに、50mL 0.1M トリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）を加えて攪拌溶解した。かかる溶液を50～120℃の適当な短鎖化温度で加熱し、試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、任意の鎖長のポリイノシン酸をサンプリングした。その結果を表 1 に示す。得られたサンプル溶液はそれぞれ透析後、常法により凍結乾燥処理し各凍結乾燥品を得た。

表 1

短鎖化温度	短鎖化時間	平均鎖長	リン酸転位率
50℃	50時間	1419 b	0.1 %
60℃	27時間	982 b	0.1 %
70℃	12時間	524 b	0.4 %
80℃	8時間	118 b	1.2 %
90℃	3時間	84 b	1.8 %
120℃	1時間	32 b	6.8 %

実施例 6

ポリシチジル酸ナトリウム塩（ $S^0_{20,w}$ （沈降定数）：8.6、ヤマサ醤油（株）製）250 mgに、50mL 0.1M トリスー塩酸緩衝液（pH 9.0）を加えて攪拌溶解した。かかる溶液を55～120℃の適当な短鎖化温度で加熱し、試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニター

しながら、任意の鎖長のポリシチジル酸をサンプリングした。その結果を表 2 に示す。得られたサンプル溶液はそれぞれ透析後、常法により凍結乾燥処理し各凍結乾燥品を得た。

表 2

短鎖化温度	短鎖化時間	平均鎖長	リン酸転位率
55℃	52時間	1923 b	0.1 %
65℃	48時間	907 b	0.1 %
75℃	23時間	489 b	0.3 %
80℃	12時間	139 b	0.8 %
90℃	8時間	76 b	1.2 %
120℃	1.5 時間	27 b	4.2 %

上記実施例 5 及び 6 の結果から明らかなように、市販のポリイノシン酸ナトリウム塩及びポリシチジル酸ナトリウム塩を短鎖化する場合、短鎖化温度が 55℃ 以下では十分な加水分解がなされなかった。そのため、短鎖化時間約 50 時間後でも 1 kb を越えるような平均鎖長を示した。一方、短鎖化温度を 120℃ としたサンプル及び短鎖化温度を 90℃ に設定したサンプルでは、加水分解の反応速度が大きすぎるため、短鎖化を制御することは困難であった。特に短鎖化温度が 120℃ の場合では、短鎖化 1 ～ 1.5 時間でオリゴヌクレオチドに近い領域にまで短鎖化された。また、このサンプルではリン酸転位率も高く、塩基部分の分解も確認された。

実施例 7

ポリアデニル酸ナトリウム塩 ($S^{0.20}_{20.0}$ (沈降定数) : 7.2、生化学工業 (株) 製) 100mg に、0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 100 mL を加えて溶解した。この溶液にヌクレアーゼ P₁ (青カビ由来、生化学工業 (株) 製) を加え、試験例 5 記載の方法により平均

鎖長をモニターしながら、25℃で3時間インキュベートし、当該ポリアデニル酸を短鎖化した（リン酸転位率 0.1%、平均鎖長 287 b）。

実施例 8

ウリジン-5'-二リン酸三ナトリウム塩 1 g 及び塩化マンガン 0.3 g に、0.2 M 炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液約 100 mL を加え、攪拌溶解した。1 N 水酸化ナトリウムを加え pH 9.5 に調整した後、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ溶液 0.2 mL を添加し、試験例 5 記載の方法により平均鎖長をモニターしながら、25℃で 10 時間反応した。かかる反応液に 0.2 M エチレンジアミン四酢酸 5 mL を加えて反応を停止し、飽和食塩水 2 mL 及びエタノール 100 mL を加えてポリウリジル酸 (549b) を沈殿させた。当該ポリウリジル酸を遠心分離し、その沈殿物を注射用水 50 mL に再溶解して透析処理した。透析内液に 1 N 水酸化ナトリウムを加え pH 8.5 に調整し、80℃で 30 分間、加熱加水分解し当該ポリウリジル酸の鎖長を調節した。かかる短鎖化ポリヌクレオチド溶液を限外ろ過膜を用いて膜分離し、鎖長分布を調整すると共に、不要な塩、短鎖化反応時の副生成物等を除去した（リン酸転位率 0.1%、平均鎖長 485 b）。

実施例 9

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール 1 g と精製卵黄レシチン 2 g に、100 mL の注射用水に溶解したマルトース 40 g を加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて 5 分間分散処理してカチオニック・リポソーム（担体）の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験室用小型乳化分散機を用

いて1時間分散処理し、カチオニック・リポソーム溶液を得た。このカチオニック・リポソーム溶液に実施例1及び2で得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸ナトリウム塩及びポリシチジル酸ナトリウム塩のそれぞれ200 mgを含む約50mLの水溶液を撹拌しながらゆっくりと添加し、更に2時間実験室用小型乳化分散機を用いて分散処理し、最後に注射用水で400 mLに定容し、本複合体を含有する組成物を得た。更にこの本複合体を含有する組成物をろ過滅菌後、1 mLずつバイアル瓶に分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。この凍結乾燥製剤を1 mLとなるように注射用水で復水したときの本複合体の平均粒子径は133 nm（光子相関法による）であった。

実施例 10

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール50 g と大豆レシチン25 gに、3 Lの注射用水に溶解したスクロース1 kgを加え撹拌混合し、マントナーガウリン型高压ホモジナイザーを用いて30分間分散処理し、注射用水で5 Lに定容してカチオニック・リポソーム（担体）の分散液を得た。かかる担体分散液に実施例1及び2で得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸ナトリウム塩及びポリシチジル酸ナトリウム塩のそれぞれ1 gを含む約2 Lの水溶液を撹拌しながらゆっくりと添加し、1 N塩酸を用いてpH 5.5に調整した後、さらに1時間、マントナーガウリン型高压ホモジナイザーを用いて分散処理し、最後に注射用水で10Lに定容し、本複合体を含有する組成物を得た。更にこの本複合体を含有する組成物を20mLずつバイアル瓶に分注した後、常法に従って凍結乾燥製剤とした。この凍結乾燥製剤を20 mL となるよ

うに注射用水で復水したときの本複合体の平均粒子径は158 nm（光子相関法による）であった。

実施例 1 1

2-0-(2- ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール 1 g と卵黄ホスファチド 2 g に、100 mLの注射用水に溶解したブドウ糖 40 g を加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて5分間分散処理した後、500 mLに定容しカチオニック・リポソーム（担体）の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験室用小型乳化分散機を用いて1時間分散処理し、カチオニック・リポソーム溶液を得た。かかる溶液を10mLずつバイアル瓶に分注し常法に従って凍結乾燥した。かかる凍結乾燥品に、実施例 1、2 若しくは 5、6 で得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸ナトリウム塩及びポリシチジル酸ナトリウム塩、及び市販のポリイノシン酸ナトリウム塩（ $S^0_{20,w}$ （沈降定数）：8.8、ヤマサ醤油（株）製）及びポリシチジル酸ナトリウム塩（ $S^0_{20,w}$ （沈降定数）：8.6、ヤマサ醤油（株）製）のそれぞれ 5 mgを含む10mLの水溶液を加え、プローブ型超音波分散機で10分間分散処理し、本複合体を含有する組成物を得た。

実施例 1 2

実施例 3 及び 4 で得られたリン酸転位の少ない短鎖化ポリアデニル酸ナトリウム塩及びポリウリジル酸ナトリウム塩のそれぞれ 100 μ gを含む1 mLの水溶液と、市販のリポフェクチン（商品名）2 mgを含む水溶液 2 mLを攪拌しながら混合し、プローブ型超音波分散機を用いて15分間分散処理し、本複合体を含有する組成物を得た。

実施例 1 3

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.8 、ヤマサ醤油 (株) 製) 約 200 mg に、0.2 M 酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) を加え、攪拌溶解した後、80℃に加熱し、試験例 6 記載の方法にてリン酸転位率をモニターしながら、任意のリン酸転位率のポリイノシン酸をサンプリングし、次いで各リン酸転位率のポリイノシン酸をホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中にて 60℃に加熱し、試験例 5 記載の方法で鎖長をモニターしながら平均鎖長が 200 ± 50 b となるよう短鎖化した。その結果を表 3 に示す。得られた短鎖化ポリイノシン酸溶液は、それぞれ透析処理した後、常法にて凍結乾燥処理し凍結乾燥品を得た。

表 3

転位反応 温度	転位反応 時間	短鎖化 温度	短鎖化 時間	平均 鎖長	リン酸 転位率
80 °C	2.5時間	60 °C	3 時間	227 b	0.7 %
	6.5時間		1.5時間	230 b	2.0 %
	9 時間		4 時間	191 b	2.8 %
	16.5時間		2 時間	228 b	4.2 %

実施例 1 4

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.6 、ヤマサ醤油 (株) 製) 約 200 mg に、0.2 M 酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) を加え、攪拌溶解した後、80℃に加熱し、試験例 6 記載の方法にてリン酸転位率をモニターしながら、任意のリン酸転位率のポリシチジル酸をサンプリングし、次いで各リン酸転位率のポリシチジル酸をホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中にて 70℃に加熱し、試験例

5 記載の方法で鎖長をモニターしながら平均鎖長が 200 ± 50 b となるように短鎖化した。その結果を表 4 に示す。得られた短鎖化ポリシチジル酸溶液は、それぞれ透析処理した後、常法にて凍結乾燥処理し凍結乾燥品を得た。

表 4

転位反応 温度	転位反応 時間	短鎖化 温度	短鎖化 時間	平均 鎖長	リン酸 転位率
80 °C	3 時間	70 °C	3 時間	157 b	1.2%
	4.5 時間		1 時間	218 b	1.9%
	6 時間		1 時間	236 b	2.7%
	10 時間	未調整		170 b	3.8%

実施例 15 二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド

実施例 1、2、13 及び 14 で得られたリン酸転位率が 0.7% のポリイノシン酸とリン酸転位率が 1.2 % のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）、リン酸転位率が 2.0 % のポリイノシン酸とリン酸転位率が 1.9% のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）、リン酸転位率が 2.8 % のポリイノシン酸とリン酸転位率が 2.7% のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド（二本鎖 RNA）を各々調製した。各二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、各ポリイノシン酸ナトリウム塩とポリシチジル酸ナトリウム塩とをトリス-塩酸緩衝液（pH 7、0.15M 塩化ナトリウム含有）に溶解し、80°C で 5 分間加熱した後、徐冷することにより得た。

比較例 1 （実施例 1 に対応する従来法による製造 - 1）

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.8 、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液にホルムアミドを 10 mL 加え、80°C で 5 時間加熱した (リン酸転位率 8.9%、平均鎖長 628 b)。

比較例 2 （実施例 2 に対応する従来法による製造 - 1）

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.6 、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液にホルムアミドを 10 mL 加え、80°C で 5 時間加熱した (リン酸転位率 4.2%、平均鎖長 751 b)。

比較例 3 （実施例 1 に対応する従来法による製造 - 2）

ポリイノシン酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.8 、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液を 90°C で 8 時間加熱した (リン酸転位率 7.1%、平均鎖長 213 b)。

比較例 4 （実施例 2 に対応する従来法による製造 - 2）

ポリシチジル酸ナトリウム塩 ($S^0_{20,w}$ (沈降定数) : 8.6 、ヤマサ醤油 (株) 製) 5 mg に注射用水 10 mL を加え攪拌溶解した。かかる溶液を 90°C で 12 時間加熱した (リン酸転位率 4.2%、平均鎖長 289 b)。

比較例 5

実施例 1 3 及び 1 4 で得られたリン酸転位率が 4.2% のポリイノシン酸とリン酸転位率が 3.8 % のポリシチジル酸とを組み合わせた二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド (二本鎖 RNA) を調製した。当該

二本鎖短鎖化ポリヌクレオチドは、ポリイノシン酸ナトリウム塩とポリシチジル酸ナトリウム塩とをポリヌクレオチドをトリスー塩酸緩衝液（pH 7、0.15M塩化ナトリウム含有）に溶解し、80℃で5分間加熱した後、徐冷することにより得た。

試験例 1 薬理活性に対する平均鎖長の及ぼす影響

実施例 9 に係る組成物の薬理活性はHeLa S3 癌細胞に対する細胞増殖抑制作用（in vitro）により評価した。実験は、HeLa S3 癌細胞を 96 穴のプレートに 10^4 細胞 /穴の密度でまき、24時間以上培養して細胞が十分にプレートに接着したことを確認後、当該組成物を添加し培養を続けた。3日間CO₂ インキュベーター内で培養した後、生細胞数を MTT法で測定した。細胞増殖阻害率を次式より算出した。その結果を表 5 に示す。

$$\text{細胞増殖阻害率(\%)} = \frac{\text{複合体処理群の吸光度値}}{\text{コントロールの吸光度値}} \times 100$$

表 5

平均鎖長（リン酸転位率）		HeLa S3 癌細胞に対する 細胞増殖阻害率（%）				
		ポリイノシン酸ナトリウム塩 + ポリシチジル酸ナトリウム塩濃度（ng/mL）				
ポリイノシン酸	ポリシチジル酸	0.1	1	10	100	1000
>>1000 b ^(a)	>>1000 b ^(b)	86	100	100	100	100
1419 b (0.1%)	1923 b (0.1%)	79	98	100	100	100
982 b (0.1%)	907 b (0.2%)	65	96	100	100	100
524 b (0.4%)	489 b (0.3%)	23	85	98	100	100
360 b (0.2%)	318 b (0.1%)	17	70	97	100	100
118 b (1.2%)	139 b (0.8%)	9	45	89	98	100
84 b (1.8%)	76 b (1.2%)	0	0	6	72	92
32 b (6.8%)	27 b (4.2%)	0	0	0	18	48

(a) ポリイノシン酸ナトリウム塩（ヤマサ醤油（株）製）

(b) ポリシチジル酸ナトリウム塩（ヤマサ醤油（株）製）

表 5 から明らかなように、癌細胞株である HeLa S3 に対する各組成物の細胞増殖抑制作用は、平均鎖長との間に強い相関があった。

表 5 では、一般的にインターフェロン誘導剤として用いられる 1000

b 以上の長鎖長ポリイノシン酸・ポリシチジル酸で最も強い増殖抑制作用を示すが、本発明による平均鎖長の範囲が 0.1kb～1 kb のリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸・ポリシチジル酸でも、やや劣るもののなお十分に強い増殖抑制作用を保持していた。また、かかる増殖抑制作用は 100 b 未満のものでは急激に低下し、オリゴ

ヌクレオチド領域に近いものではほとんど活性を示さなかった。

試験例 2 骨髄細胞に対する影響

毒性評価として、骨髄毒性を検討した。ddY マウス（雄、8 週齢）に、市販のポリイノシン酸ナトリウム塩（ $S^{0}_{20,w}$ （沈降定数）：8.8、ヤマサ醤油（株）製）及びポリシチジル酸ナトリウム塩（ $S^{0}_{20,w}$ （沈降定数）：8.6、ヤマサ醤油（株）製）と実施例 5 及び 6 に係る、リン酸転位の少ないポリイノシン酸、ポリシチジル酸のうち平均鎖長がそれぞれ 982 b 及び 907 b のものを静脈内投与し、翌日大腿骨より骨髄細胞を得た。細胞をニューメチレンブルー及びギムザ染色し、網状赤血球と成熟赤血球の数を測定した。その結果を表 6 に示す。表 6 の骨髄毒性は全赤血球数に対する網状赤血球数の比であり、次式により定義される。また、* 印は有意水準 $p < 0.01$ で、ポリヌクレオチドなしの媒体のみの静脈内投与から得られたコントロール群と有意差（ダネットの多重比較法による）があることを意味している。

$$\text{骨髄毒性} = \frac{\text{網状赤血球数}}{\text{網状赤血球数} + \text{成熟赤血球数}}$$

表 6

平均鎖長		投与量	骨髄毒性	コントロール群に対する変化率
ポリイノシン酸	ポリシチジル酸			
>>1000 b ^(a)	>>1000 b ^(b)	1mg/kg	0.23*	39 %
		5mg/kg	0.15*	61 %
982 b	907 b	5mg/kg	0.31	17 %
		25mg/kg	0.29	24 %

(a) ポリイノシン酸ナトリウム塩（ヤマサ醤油（株）製）

(b) ポリシチジル酸ナトリウム塩（ヤマサ醤油（株）製）

表 6 から明らかなように、一般的にインターフェロン誘導剤として用いられる 1000 b を超える長鎖長のポリイノシン酸・ポリシチジル酸では、1 mg/kg の投与量でもコントロールに対する変化が 39% に達したにもかかわらず、本発明に係る、平均鎖長の範囲が 0.1 kb ~ 1 kb のリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸・ポリシチジル酸では、その 25 倍の投与量でもコントロールに対して有意な差がなかった。この結果からポリイノシン酸・ポリシチジル酸の毒性は薬理活性と同様、平均鎖長と極めて相関が強いことがわかった。かかる毒性が、本発明に係る短鎖化ポリヌクレオチドによって飛躍的に改善されたことは全く意外であった。

試験例 3 A431 癌細胞に対する細胞増殖抑制作用 (*in vitro*) (平均鎖長 200 ± 50b)

実施例 1 3 及び 1 4 に係るリン酸転位率が 0.7 ~ 4.2% のポリイノシン酸とリン酸転位率が 1.2 ~ 3.8% のポリシチジル酸、実施例 1 及び 2 に係る短鎖化ポリイノシン酸及びポリシチジル酸を用い、実施例 1 1 と同様に操作して組成物を調製した。A431 癌細胞を 96 穴のプレートに 10^4 細胞 / 穴の密度でまき、5 時間以上培養して細胞が十分にプレートに接着したことを確認後、当該組成物を添加し培養を続けた。各組成物添加後、3 日間 CO₂ インキュベーター内で培養した後、生細胞数を MTT 法で測定した。細胞増殖阻害率を式 1 から求め、かかる細胞増殖阻害率から 50% 細胞増殖阻害率に相当するポリイノシン酸ナトリウム塩とポリシチジル酸ナトリウム塩の合計濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。その結果を表 7 に示す。

表 7

		ポリイノシン酸のリン酸転位率				
		0.2%	0.7%	2.0%	2.8%	4.2%
ポリシチジル酸 のリン酸 転位率	0.1%	1.2	1.2	1.3	3.5	6.5
	1.2%	1.1	1.2	1.4	5.6	10
	1.9%	1.2	1.3	1.4	8.2	17
	2.7%	4.2	6.2	10	17	36
	3.8%	7.8	11	23	41	66
		A431癌細胞に対する 50%細胞増殖阻害濃度 (ng/ml)				

表 7 から明らかなように、癌細胞である A431 に対する当該組成物の細胞増殖抑制作用は、リン酸転位率との間に強い相関があった。即ち、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸に拘わらずリン酸基の 3' 位から 2' 位への転位が多いものほど、増殖抑制作用が弱くなる傾向を示した。注目される点は、本発明に係るリン酸転位の少ない短鎖化ポリイノシン酸、短鎖化ポリシチジル酸（リン酸転位率 3 % 以下、特に 2 % 以下）の組み合わせでは、増殖抑制作用が飛躍的に強かった。また、リン酸転位率が 3 %、特に 2 % を超えるポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせでは相乗的に作用が弱くなる傾向があった。例えば表 7 で、リン酸基の転位率が 2.0 % 及び 1.9 % のポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせは、同じく 2.8 % 及び 2.7 % 若しくは 4.2 % 及び 3.8 % のポリイノシン酸、ポリシチジル酸の組み合わせに比べ IC₅₀ の比が 12 倍若しくは 47 倍も向上した。リン酸基の 3' 位から 2' 位への転位率が 3 %、特に 2 % を境界として、薬理活性がこのように急激に向上することは、極めて意外であった。

試験例 4 リン酸転位による融解温度 (T_m) 及び薬理活性の変化

二本鎖RNAは温度を上げていくと特定の温度のところで、一本鎖RNAに解離する。この温度はRNAに含まれる塩基の種類により特定の値を示すことから、この温度を二本鎖RNAの融解温度とし、一般には T_m 値と呼んでいる。このような T_m 値の測定には様々な方法があるが、本試験例では最も一般的な吸光光度法を用い、実施例15及び比較例5に係る二本鎖RNAの T_m 値を測定した。その結果を表8に示す。表8に併記した IC_{50} 値は、試験例3による結果である。

表 8

ポリイノシン酸 リン酸転位率	ポリシチジル酸 リン酸転位率	融解温度 (T_m 値)	IC_{50}
0.2 %	0.1 %	61°C	1.2 ng / mL
0.7 %	1.2 %	62°C	1.2 ng / mL
2.0 %	1.9 %	59°C	1.4 ng / mL
2.8 %	2.7 %	59°C	17 ng / mL
4.2 %	3.8 %	58°C	66 ng / mL

リン酸転位率がおおよそ0～4%のポリイノシン酸・ポリシチジル酸で T_m 値を測定した結果、各組み合わせにおいて顕著な差は見られなかった（一般にインターフェロン誘導剤として用いられるような長鎖長のポリイノシン酸・ポリシチジル酸の T_m 値は61°Cである）。即ち、リン酸転位率がおおよそ0～4%のポリイノシン酸・ポリシチジル酸は、二本鎖RNAの特徴である二重らせん構造をとり得ることが明らかとなった。しかしながら、試験例3から、リン酸転位率が2%ないしは3%を境として薬理活性が4倍～50倍以上も異なることから、ポリイノシン酸・ポリシチジル酸の主薬効である免疫賦活作用や抗癌作用は、二本鎖RNAの二重らせん構造のみに影響す

るのではなく、リン酸基の転位率も影響することがわかった。しかもその薬理活性は、リン酸基の3'位から2'位への転位が2%ないしは3%を境にして急激に向上することがわかり、全く意外なことであった。

試験例5 短鎖化ポリヌクレオチドの平均鎖長の測定（GPC法）

1 mg/mL のポリヌクレオチド水溶液を用いて、下記のゲルろ過クロマトグラフィー（GPC）操作条件で試験し、平均鎖長を求めた。

GPC 操作条件

検出波長	: UV 260nm
カラム	: 東ソーTSKgel G5000PWXL 7.8mmφ × 300mm
移動相	: 7M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5)
流速	: 0.5mL/min.
サイズマーカー	: RNA Ladder (1770 b, 1520 b, 1280 b, 780 b, 530 b, 400 b, 280 b, 155 b) (ギブコ BRL 社製)

試験例6 リン酸転位率の測定

1 mg/mL のポリヌクレオチド水溶液 1 mLに、500U/mL のヌクレアーゼP₁（青カビ由来、生化学工業社製）水溶液 3.2mL を加え、さらに水を加えて 5 mLに希釈した。かかる水溶液を37℃の湯浴上で1時間反応させた後、水を加えて10mLとした。かかる反応液から3.2mL をとり、0.1U/mL アルカリホスファターゼ（仔牛小腸由来、生化学工業社製）水溶液 0.8mL を加えた後、37℃の湯浴上で30分間反応させた。この溶液を適当に希釈し、下記の液体クロマトグラフィー操作条件により試験を行い、2'-5' リン酸ジエステル結合を有する二量体を定量し、リン酸転位率を測定した。

液体クロマトグラフィー操作条件

検出波長 : UV 260nm
カラム : 資生堂カプセルバック C₁₈ UG120 5 μ m 4.6mm ϕ \times 250mm
移動相 : 5 mM硫酸水素テトラチルアンモニウムを含む50mMリン酸緩衝液
(pH8)とメタノールの混液 (95:5)
流速 : 1 mL/min.

請 求 の 範 囲

1. 短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5'リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の3%以下であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

2. ポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸若しくはそのアナログ、ポリシチジル酸若しくはそのアナログ、ポリアデニル酸若しくはそのアナログ、又はポリウリジル酸若しくはそのアナログである、請求項1記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

3. 平均鎖長が0.1k bases～1k basesの範囲内にある、請求項1又は2記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

4. 請求項1～3のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩において、二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩から形成される二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

5. 二本鎖を形成しうる2つの短鎖化ポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸とポリシチジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸、ポリイノシン酸とポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸アナログ及びポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸アナログからなる群から選択される、請求項4記載の二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

6. ポリヌクレオチド又はその塩を、pH7～10の溶液中、20～

110℃の温度条件下で短鎖化することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩の製法。

7. ポリヌクレオチド又はその塩を、ホスホジエステラーゼで短鎖化することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

8. 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、請求項1～3のいずれかに記載の短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩、又は請求項4～5のいずれかに記載の二本鎖短鎖化ポリヌクレオチド若しくはその塩とを必須構成成分として形成される複合体を含有する組成物。

9. 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、正電荷を有する担体である、請求項8記載の組成物。

10. 正電荷を有する担体が、カチオニック・リポソームである、請求項9記載の組成物。

11. 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-0-ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される担体である、請求項8記載の組成物。

12. 組成物が薬剤である請求項8～11のいずれかに記載の組成物。

13. 薬剤が、インターフェロン誘導化剤、免疫賦活剤、細胞内ヌクレアーゼ活性化剤、癌治療剤もしくは予防剤、又は肝炎治療剤もしくは予防剤である請求項12記載の組成物。

1127
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

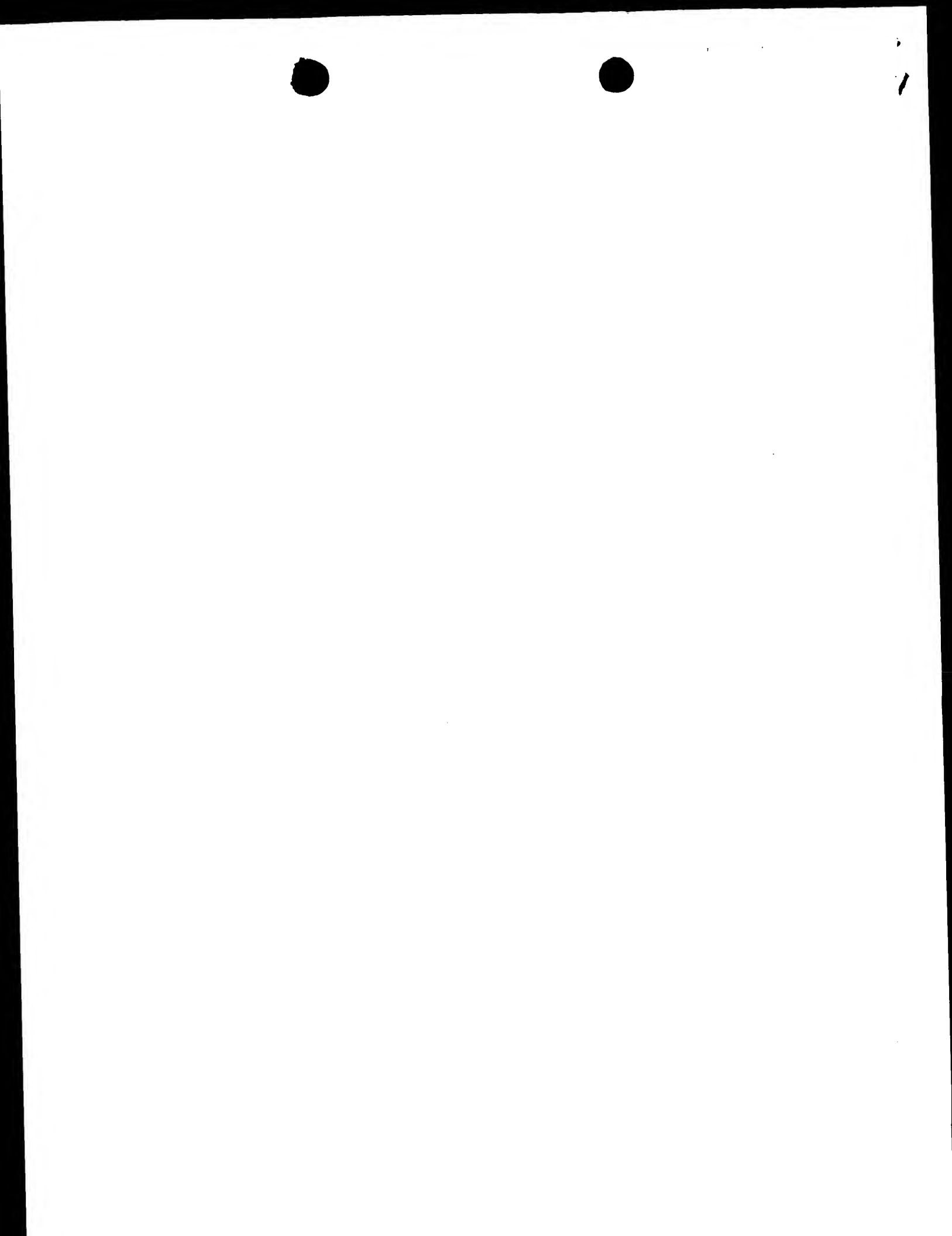
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P-416	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00778	International filing date (day/month/year) 14 February 2000 (14.02.00)	Priority date (day/month/year) 15 February 1999 (15.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 21/02, A61K 31/7088, A61P 37/04, 43/00		
Applicant NIPPON SHINYAKU CO. LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 04 August 2000 (04.08.00)	Date of completion of this report 11 January 2001 (11.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-30, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1,3,5-7,14-23, filed with the letter of 25 December 2000 (25.12.2000)
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 2,4,8-13
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- 1: US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30 May 1972
- 2: JP, 1-238597, A (Nippon Shinyaku Co., Ltd.) 22 September 1989
- 3: WO, 94/19314, A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd.) 1 September 1994
- 4: Tampakushitsu Kakusan Koso, Vol. 40, No. 10, 1995, p. 141-150
- 5: "Phosphodiesterase," Seikagaku Jiten, 1998, p. 1308-1309
- 6: Journal of Fermentation Technology, Vol. 64, No. 6, 1986, p. 517-522
- 7: Nucleic Acids Research Symposium Series, No. 18, 1987, p. 113-116
- 8: Japanese Journal of Microbiology, Vol. 20, No. 2, 1976, p. 71-76
- 9: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 135, No. 3, 1970, p. 911-916
- 10: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 135, No. 3, 1970, p. 917-921
- 11: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 141, No. 3, 1972, p. 1068-1072
- 12: Journal of General of Virology, Vol. 23, No. 1, 1974, p. 83-89

Claims 1, 3, 5-7, and 14-23

The inventions set forth in Claims 1, 3, 5-7, and 14-23 are not described in documents 1-12 cited in the international search report, and therefore appear to be novel and appear to involve an inventive step.

Documents 1, 2, and 6-12 are documents concerning the advanced technology that is most relevant to this application. These documents state that the double-stranded polynucleotides in which two species of polynucleotides form a complex have various physiological functions, and that these physiological functions are dependent on the size of the double-stranded RNA. Especially, documents 1 and 2 state that when the chains of double-stranded RNA from homopolynucleotides are shortened, they do not lose their physiological function and have reduced toxicity.

However, documents 1, 2, and 6-12 do not describe the 2'-5' phosphoric diester linkages president in these polynucleotides.

In addition, document 4 describes a transfer reaction from the 3'-5' phosphoric diester linkage to the 2'-5' phosphoric diester linkage, but it does not state that 2'-5' phosphoric diester linkages constitute 0.1%-3% of the total phosphoric diester linkages of the polynucleotides.

Based on the above, this examination finds that persons skilled in the art cannot easily obtaining polynucleotides in which 2'-5' phosphoric diester linkages constitute 0.1%-3% of the total phosphoric diester linkages.

PCT

国際予備審査報告

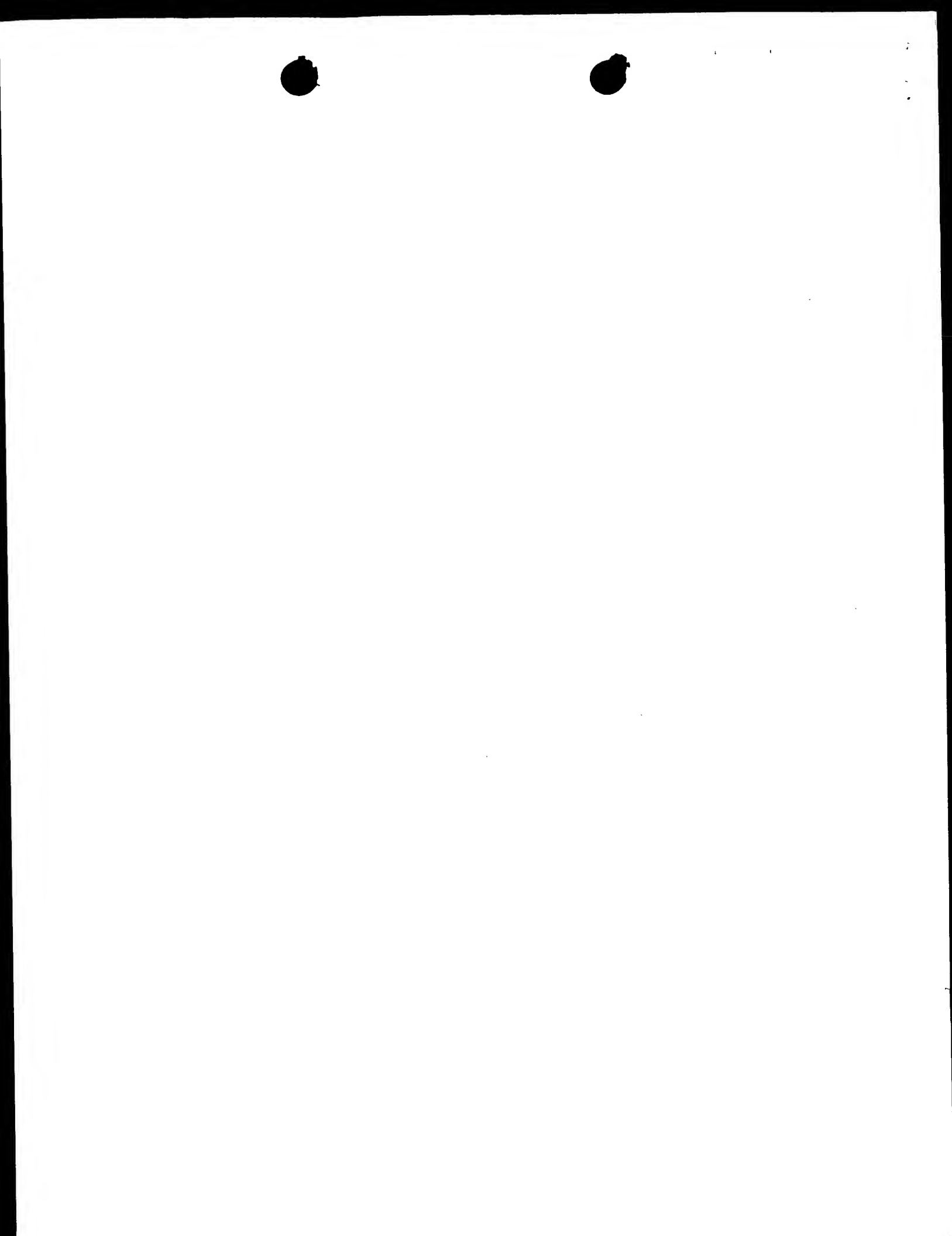
(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 P-416	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00778	国際出願日 (日.月.年) 14.02.00	優先日 (日.月.年) 15.02.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00		
出願人 (氏名又は名称) 日本新薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 3 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - II ☐ 優先権
 - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - IV ☐ 発明の単一性の欠如
 - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ☐ ある種の引用文献
 - VII ☐ 国際出願の不備
 - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.08.00	国際予備審査報告を作成した日 11.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4P 9282



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-30 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 3, 5-7, 14-23 項、 25.12.00 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 2, 4, 8-13 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1, 3, 5-7, 14-23

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1, 3, 5-7, 14-23

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1, 3, 5-7, 14-23

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 1: US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30.5月.1972
- 2: JP, 1-238597, A (日本新薬株式会社) 22.9月.1989
- 3: WO, 94/19314, A1 (日本新薬株式会社) 1.9月.1994
- 4: 「蛋白質 核酸 酵素」、1995年、第40巻、第10号、第141-150頁
- 5: 「生化学辞典」、1998年、第1308-1309頁「ホスホジエステラーゼ」
- 6: Journal of Fermentation Technology, 1986, Vol. 64, No. 6, p. 517-522
- 7: Nucleic Acids Research Symposium Series, 1987, No. 18, p. 113-116
- 8: Japanese Journal of Microbiology, 1976, Vol. 20, No. 2, p. 71-76
- 9: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 911-916
- 10: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 917-921
- 11: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1972, Vol. 141, No. 3, p. 1068-1072
- 12: Journal of General Virology, 1974, Vol. 23, No. 1, p. 83-89

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23

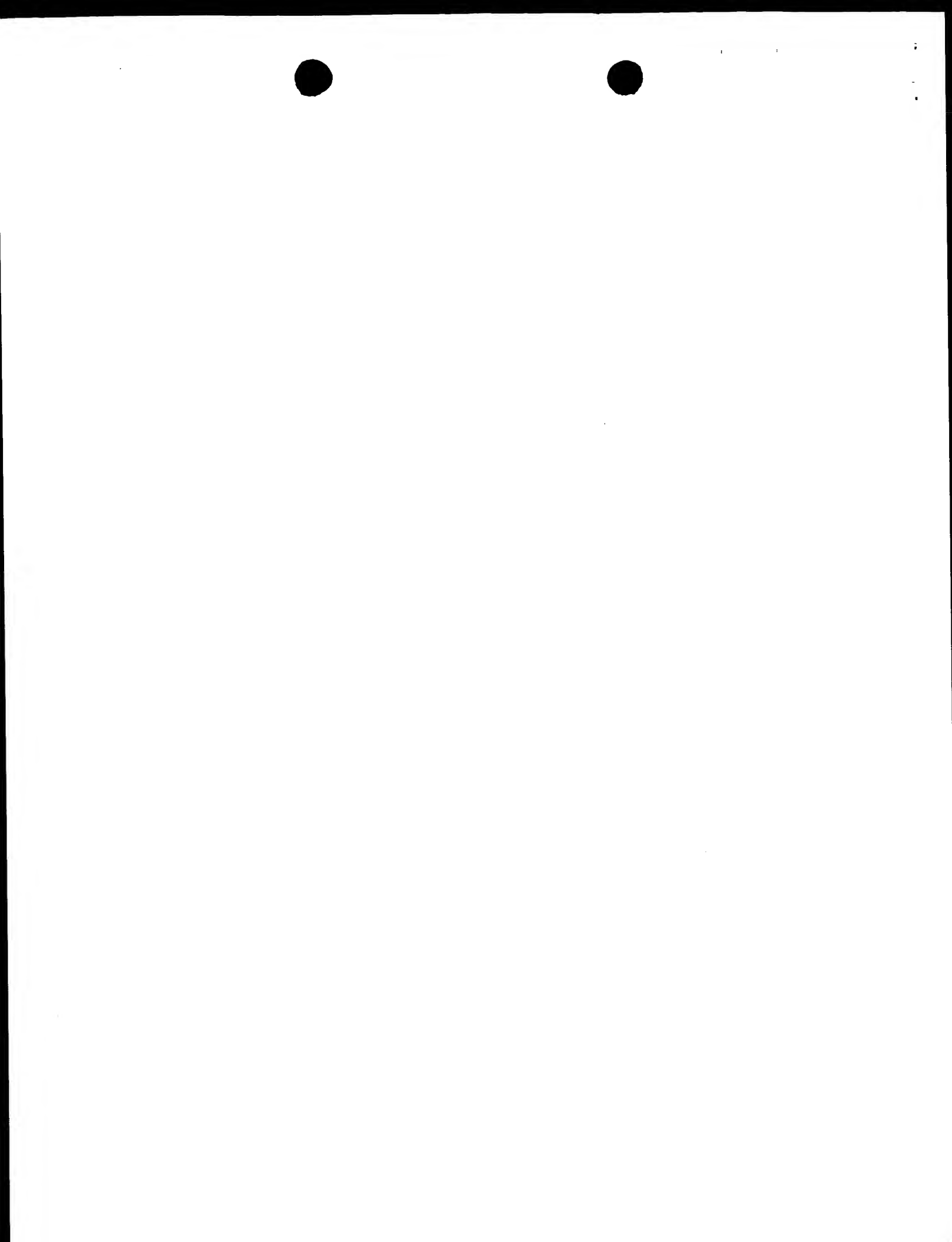
請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23 に記載された発明は、国際調査報告に表示された上記の文献 1-12 の何れにも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。

本願に最も関連のある先行技術文献であると認められる文献 1, 2, 6-12 には、2 種のポリリボヌクレオチドが複合体化した二重鎖ポリリボヌクレオチドが種々の生理活性機能を有すること、及び、該生理活性機能は二重鎖 RNA のサイズに依存して変化することが記載されている。特に、文献 1 及び 2 には、ホモポリリボヌクレオチドからなる二重鎖 RNA を短鎖化すると、該生理活性機能を損なうことなく、毒性を低減できることが記載されている。

しかしながら、文献 1, 2, 6-12 には、上記ポリリボヌクレオチドに存在する 2'-5' リン酸ジエステル結合については何ら記載されていない。

また、文献 4 には、3'-5' リン酸ジエステル結合から 2'-5' リン酸ジエステル結合への転移反応について記載されているが、ポリリボヌクレオチドの全リン酸ジエステル結合の 0.1%~3% を 2'-5' リン酸ジエステル結合とすることについては何ら記載されていない。

以上のことから、全リン酸ジエステル結合の 0.1%~3% が 2'-5' リン酸ジエステル結合であるポリリボヌクレオチドを得ることが当業者にとって容易であったとも認められない。



127

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

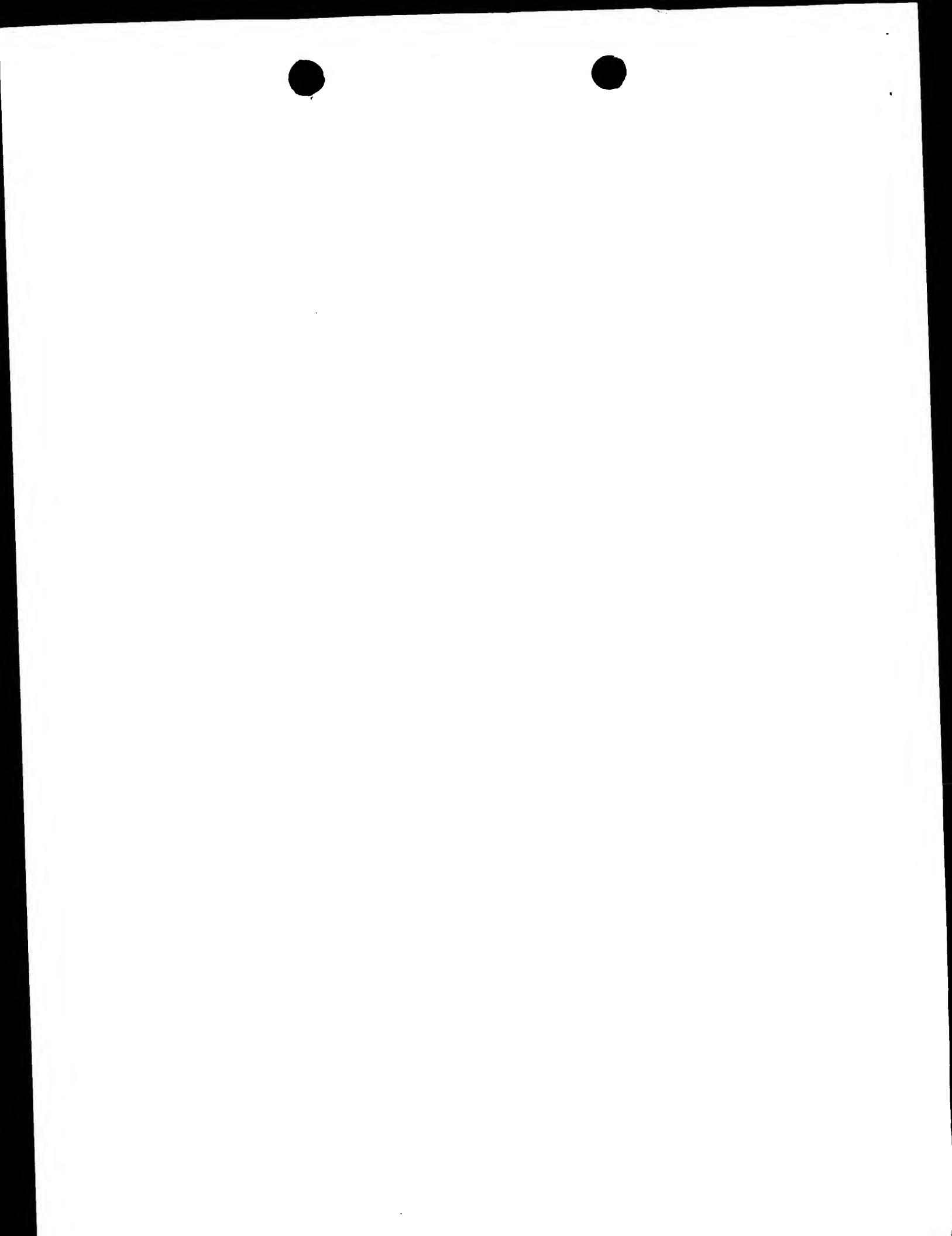
Applicant's or agent's file reference P-416	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00778	International filing date (day/month/year) 14 February 2000 (14.02.00)	Priority date (day/month/year) 15 February 1999 (15.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 21/02, A61K 31/7088, A61P 37/04, 43/00		
Applicant NIPPON SHINYAKU CO. LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 August 2000 (04.08.00)	Date of completion of this report 11 January 2001 (11.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-30, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1,3,5-7,14-23, filed with the letter of 25 December 2000 (25.12.2000)
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 2,4,8-13
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00778

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1,3,5-7,14-23	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- 1: US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30 May 1972
- 2: JP, 1-238597, A (Nippon Shinyaku Co., Ltd.) 22 September 1989
- 3: WO, 94/19314, A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd.) 1 September 1994
- 4: Tampakushitsu Kakusan Koso, Vol. 40, No. 10, 1995, p. 141-150
- 5: "Phosphodiesterase," Seikagaku Jiten, 1998, p. 1308-1309
- 6: Journal of Fermentation Technology, Vol. 64, No. 6, 1986, p. 517-522
- 7: Nucleic Acids Research Symposium Series, No. 18, 1987, p. 113-116
- 8: Japanese Journal of Microbiology, Vol. 20, No. 2, 1976, p. 71-76
- 9: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 135, No. 3, 1970, p. 911-916
- 10: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 135, No. 3, 1970, p. 917-921
- 11: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 141, No. 3, 1972, p. 1068-1072
- 12: Journal of General of Virology, Vol. 23, No. 1, 1974, p. 83-89

Claims 1, 3, 5-7, and 14-23

The inventions set forth in Claims 1, 3, 5-7, and 14-23 are not described in documents 1-12 cited in the international search report, and therefore appear to be novel and appear to involve an inventive step.

Documents 1, 2, and 6-12 are documents concerning the advanced technology that is most relevant to this application. These documents state that the double-stranded polynucleotides in which two species of polynucleotides form a complex have various physiological functions, and that these physiological functions are dependent on the size of the double-stranded RNA. Especially, documents 1 and 2 state that when the chains of double-stranded RNA from homopolynucleotides are shortened, they do not lose their physiological function and have reduced toxicity.

However, documents 1, 2, and 6-12 do not describe the 2'-5' phosphoric diester linkages president in these polynucleotides.

In addition, document 4 describes a transfer reaction from the 3'-5' phosphoric diester linkage to the 2'-5' phosphoric diester linkage, but it does not state that 2'-5' phosphoric diester linkages constitute 0.1%-3% of the total phosphoric diester linkages of the polynucleotides.

Based on the above, this examination finds that persons skilled in the art cannot easily obtaining polynucleotides in which 2'-5' phosphoric diester linkages constitute 0.1%-3% of the total phosphoric diester linkages.



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 26 JAN 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P-416	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00778	国際出願日 (日.月.年) 14.02.00	優先日 (日.月.年) 15.02.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C07H21/02, A61K31/7088, A61P37/04, 43/00		
出願人(氏名又は名称) 日本新薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 3 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.08.00	国際予備審査報告を作成した日 11.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 中木 亜希 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4P 9282



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-30 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 3, 5-7, 14-23 項、 25. 12. 00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 2, 4, 8-13 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 1 : US, 3666646, A (Merck & Co., Inc.) 30.5月.1972
- 2 : JP, 1-238597, A (日本新薬株式会社) 22. 9月.1989
- 3 : WO, 94/19314, A1 (日本新薬株式会社) 1. 9月.1994
- 4 : 「蛋白質 核酸 酵素」、1995年、第40巻、第10号、第141-150頁
- 5 : 「生化学辞典」、1998年、第1308-1309頁「ホスホジエステラーゼ」
- 6 : Journal of Fermentation Technology, 1986, Vol. 64, No. 6, p. 517-522
- 7 : Nucleic Acids Research Symposium Series, 1987, No. 18, p. 113-116
- 8 : Japanese Journal of Microbiology, 1976, Vol. 20, No. 2, p. 71-76
- 9 : Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 911-916
- 10 : Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1970, Vol. 135, No. 3, p. 917-921
- 11 : Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1972, Vol. 141, No. 3, p. 1068-1072
- 12 : Journal of General Virology, 1974, Vol. 23, No. 1, p. 83-89

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23

請求の範囲 1, 3, 5-7, 14-23に記載された発明は、国際調査報告に表示された上記の文献1-12の何れにも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。

本願に最も関連のある先行技術文献であると認められる文献1, 2, 6-12には、2種のポリリボヌクレオチドが複合体化した二重鎖ポリリボヌクレオチドが種々の生理活性機能を有すること、及び、該生理活性機能は二重鎖RNAのサイズに依存して変化することが記載されている。特に、文献1及び2には、ホモポリリボヌクレオチドからなる二重鎖RNAを短鎖化すると、該生理活性機能を損なうことなく、毒性を低減できることが記載されている。

しかしながら、文献1, 2, 6-12には、上記ポリリボヌクレオチドに存在する2'-5'リン酸ジエステル結合については何ら記載されていない。

また、文献4には、3'-5'リン酸ジエステル結合から2'-5'リン酸ジエステル結合への転移反応について記載されているが、ポリリボヌクレオチドの全リン酸ジエステル結合の0.1%~3%を2'-5'リン酸ジエステル結合とすることについては何ら記載されていない。

以上のことから、全リン酸ジエステル結合の0.1%~3%が2'-5'リン酸ジエステル結合であるポリリボヌクレオチドを得ることが当業者にとって容易であったとも認められない。



請 求 の 範 囲

1. (補正後) 短鎖化されたポリヌクレオチド又はその塩において、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 0.1 % ~ 3 % の範囲内であることを特徴とする短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩。

2. (削除)

3. (補正後) 平均鎖長が 0.1k bases ~ 1k bases の範囲内にある、請求項 1 記載のポリヌクレオチド又はその塩。

4. (削除)

5. (補正後) 製造過程において、リン酸転位率を測定することを特徴とする、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3 % 以下であり、かつ平均鎖長が 0.1k bases ~ 1k bases の範囲内にあるポリヌクレオチド又はその塩の製法。

6. (補正後) ポリヌクレオチド又はその塩を、pH 7 ~ 10 の溶液中、20 ~ 110℃ の温度条件下で短鎖化し、かつリン酸転位率を測定することを特徴とする、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3 % 以下である短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩の製法。

7. (補正後) ポリヌクレオチド又はその塩を、ホスホジエステラーゼで短鎖化し、かつリン酸転位率を測定することを特徴とする、2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 3 % 以下である短鎖化ポリヌクレオチド又はその塩の製法。

8. (削除)



9. (削除)

10. (削除)

11. (削除)

12. (削除)

13. (削除)

14. (追加) 2'-5' リン酸ジエステル結合が全リン酸ジエステル結合の 0.1% ~ 3% の範囲内であることを特徴とする、平均鎖長が 0.1 k bases ~ 1 k bases の範囲内にあるポリヌクレオチド又はその塩。

15. (追加) ポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸若しくはそのアナログ、ポリシチジル酸若しくはそのアナログ、ポリアデニル酸若しくはそのアナログ、又はポリウリジル酸若しくはそのアナログである、請求項 1、3、又は 14 記載のポリヌクレオチド又はその塩。

16. (追加) 請求項 1、3、14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド又はその塩において、二本鎖を形成しうる 2 つのポリヌクレオチド又はその塩から形成される二本鎖ポリヌクレオチド又はその塩。

17. (追加) 二本鎖を形成しうる 2 つのポリヌクレオチドが、ポリイノシン酸とポリシチジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸、ポリイノシン酸とポリシチジル酸アナログ、ポリイノシン酸アナログとポリシチジル酸アナログ、ポリアデニル酸アナログとポリウリジル酸、ポリアデニル酸とポリウリジル酸アナログ及びポリアデニル酸アナログとポ



32 / 1

リウリジル酸アナログからなる群から選択される、請求項 16 記載の二本鎖ポリヌクレオチド又はその塩。

18. (追加) 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体と、請求項 1、3、14 若しくは 15 のいずれかに記載のポリヌクレオチド若しくはその塩、又は請求項 16 若しくは 17 のいずれかに記載の二本鎖ポリヌクレオチド若しくはその塩とを必須構成成分として形成される複合体を含有する組成物。

19. (追加) 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、正電荷を有する担体である、請求項 18 記載の組成物。

20. (追加) 正電荷を有する担体が、カチオニック・リポソームである、請求項 19 記載の組成物。

21. (追加) 薬物を細胞内へ移入するのに有効な担体が、2- α -(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3- α -ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体である、請求項 18 記載の組成物。

22. (追加) 組成物が薬剤である請求項 18～21 のいずれかに記載の組成物。

23. (追加) 薬剤が、インターフェロン誘導化剤、免疫賦活剤、細胞内ヌクレアーゼ活性化剤、癌治療剤若しくは予防剤、又は肝炎治療剤若しくは予防剤である請求項 22 記載の組成物。

